

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006820

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2005-044639
Filing date: 21 February 2005 (21.02.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 09 June 2005 (09.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2005年 2月 21日

出願番号
Application Number: 特願 2005-044639

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出願人
Applicant(s): ジェノミディア株式会社
アンジェスMG株式会社

2005年 5月 25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 00408-4
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/00
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府豊中市上野西 4-8-30-501
 【氏名】 小谷 均
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6-12-8
 【氏名】 金田 安史
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府豊中市南桜塚 4-13-8-407
 【氏名】 河野 博和
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府池田市旭丘 1-6-10-103
 【氏名】 福村 正之
【特許出願人】
 【識別番号】 302060281
 【氏名又は名称】 ジェノミディア株式会社
 【代表者】 中塚 琢磨
【特許出願人】
 【識別番号】 500409323
 【氏名又は名称】 アンジェスMG株式会社
 【代表者】 山田 英
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-108599
 【出願日】 平成16年 3月 31日
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-136756
 【出願日】 平成16年 4月 30日
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-172449
 【出願日】 平成16年 6月 10日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 194136
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント。

【請求項 2】

前記アジュバントが免疫応答を増強させるアジュバントである、請求項 1 記載のアジュバント。

【請求項 3】

前記アジュバントが抗腫瘍免疫を増強させるアジュバントである、請求項 1 または 2 記載のアジュバント。

【請求項 4】

前記ウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスである、請求項 1 ないし 3 記載のアジュバント。

【請求項 5】

前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた 1 種である、請求項 1 ないし 4 記載のアジュバント。

【請求項 6】

前記ウイルスがセンダイウイルスである、請求項 1 ないし 5 記載のアジュバント。

【請求項 7】

センダイウイルスエンベロープの免疫アジュバントとしての使用。

【請求項 8】

センダイウイルスエンベロープの抗腫瘍免疫アジュバントとしての使用。

【請求項 9】

抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として CTL 細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープとシスプラチニンの使用。

【請求項 10】

抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として CTL 細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープ、シスプラチニンおよび化学療法剤の使用。

【請求項 11】

前記ウイルスエンベロープがセンダイウイルスエンベロープ (HV-E) である、請求項 9 または 10 記載の使用。

【請求項 12】

前記化学療法剤がブレオマイシンである、請求項 9 ないし 11 記載の使用。

【請求項 13】

免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項 14】

化学療法剤が制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤である、請求項 13 記載の医薬組成物。

【請求項 15】

化学療法剤がブレオマイシン類、アントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、カンプトテシン類、シスプラチニン類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル (5-FU) およびその誘導体、ピラルビシンおよびそれらの薬理学的に許容される塩から選ばれた 1 種以上である、請求項 13 または 14 記載の医薬組成物。

【請求項 16】

ブレオマイシン類が、ブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項 13 ないし 15 記載の医薬組成物。

【請求項 17】

ブレオマイシン類が、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ペブロマイシンである、請求項 13ないし 16記載の医薬組成物。

【請求項 18】

免疫惹起能を有するウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルベスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルス由来である、請求項 13ないし 17記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルベスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた1種である、請求項 13ないし 18記載の医薬組成物。

【請求項 20】

化学療法剤が塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ペブロマイシンから選ばれた1種以上であり、ウイルスがセンダイウイルスである、請求項 13ないし 19記載の医薬組成物。

【請求項 21】

注射剤である請求項 13ないし 20記載の医薬組成物。

【請求項 22】

固体癌の治療剤である、請求項 13ないし 21記載の医薬組成物。

【請求項 23】

固体癌が、肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫または原発不明癌から選ばれた1種である、請求項 13ないし 22記載の医薬組成物。

【請求項 24】

消化器癌が胃癌、大腸癌または食道癌から選ばれた1種である、請求項 23記載の医薬組成物。

【請求項 25】

頭頸部癌が上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌または口腔癌から選ばれた1種である、請求項 23記載の医薬組成物。

【請求項 26】

婦人科領域の癌が子宮癌、卵巣癌または子宮頸癌から選ばれた1種である、請求項 23記載の医薬組成物。

【請求項 27】

泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎孟・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた1種である、請求項 23記載の医薬組成物。

【請求項 28】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-Eに封入した抗ガン剤または免疫促進剤を含有する医薬組成物。

【請求項 29】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-Eに封入した抗ガン剤または免疫促進剤とさらなる抗ガン剤を含有する医薬組成物。

【請求項 30】

HVJ-Eがリボソームでないことを特徴とする請求項 28または 29記載の医薬組成物。

【請求項 31】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-Eに封入した抗ガン剤または免疫促進剤を含有する医薬組成物の使用。

【請求項 32】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-Eに封入した抗ガン

剤または免疫促進剤とさらなる抗ガン剤を含有する医薬組成物の使用。

【請求項 3 3】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する薬剤組成物を製造するための、アジュバントとしてのHVJ-Eの使用。

【請求項 3 4】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、アジュバントおよび抗ガン剤または免疫促進剤封入ベクターとしての、HVJ-Eの使用。

【請求項 3 5】

生体内において腫瘍免疫を惹起させるための、HVJ-Eと抗ガン剤の併用。

【請求項 3 6】

固形腫瘍組織内に細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を導入し抗腫瘍効果を惹起するための、HVJ-Eの使用。

【請求項 3 7】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導する術前補助療法(ネオアジュバント療法)としてのHVJ-Eの使用。

【請求項 3 8】

HVJ-Eがリボソームでないことを特徴とする請求項31ないし37記載の使用法。

【請求項 3 9】

抗ガン剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはベプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項28ないし37記載の医薬組成物またはその使用。

【請求項 4 0】

免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、請求項28ないし37記載の医薬組成物またはその使用。

【請求項 4 1】

泌尿器科領域の癌を治療するための、HVJ-Eと抗ガン剤からなる医薬組成物。

【請求項 4 2】

泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎孟・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた1種である、請求項41記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

抗ガン剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクラルビシン、アムルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ピラルビシンまたはミトキサントロンから選ばれた1種である、請求項41または42記載の医薬組成物。

【請求項 4 4】

膀胱癌を治療するための、HVJ-Eとアドリアマイシンからなる医薬組成物。

【請求項 4 5】

膀胱癌を治療するための、HVJ-Eとアドリアマイシンからなる膀胱内注入用医薬組成物。

【請求項 4 6】

膀胱癌を治療するための、HVJ-Eとアドリアマイシンの併用。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗腫瘍作用を有する組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体内で抗腫瘍免疫を惹起するためのビヒクルに関する。より詳しくは、ウイルス、不活性化ウイルス、特に不活性化HVJ(センダイウイルス)に、化学療法剤、好ましくは抗がん剤を封入し固形腫瘍内に導入し、さらに抗癌剤全身投与と併用することにより、より高い抗腫瘍免疫を惹起させることに関する。

【背景技術】

【0002】

現在のがん治療における治癒率は約50%程度といわれ、その治癒は一般的には外科療法や放射線療法など局所療法によりもたらされる場合が多い。特に固形癌の治療においては、全身療法である化学療法が単独で治癒に貢献する割合は極めて少なく、各種療法と併用されるのが通常である。

【0003】

一方外科療法では、全ての臓器癌の手術が可能となり、治療法として既に完成域に達していると考えられ、これ以上の治癒率向上は望めない。また放射線療法も感受性のある臓器癌の治療成績がほぼ一定率に達しており、同様にこれ以上の治癒率向上は望めない。

【0004】

従ってこれらの治療法により、今後の癌治癒率の大幅な向上は期待しがたいため、癌の治癒率を現状の50%からさらに改善し癌制圧に達するには、より優れた化学療法の開発が欠かせない。

【0005】

化学療法に使用される抗癌剤は、癌細胞のような増殖能の高い細胞の殺細胞効果を目的としており、正常細胞、特に細胞増殖能の高い骨髄細胞等に与えるダメージが大きく、その結果患者に与える苦痛も大である。これは抗癌剤の送達法が注射剤による全身への投与であり、がん細胞以外の正常細胞にも抗癌剤が到達し、正常細胞が殺傷されホメオスタシスが機能しなくなるためである。

【0006】

しかし現状では、抗癌剤を単独投与した際の効果は概ね30%程度であるとされており、ゲノムの遺伝子情報解析研究が進められ適切な抗癌剤の選定が今後可能なることも期待されているが、現時点での抗癌剤療法は効果と比較して副作用が高いといわれている。

【0007】

これは抗癌剤全身投与により正常細胞がダメージを受けたためである。よって、癌組織特異的な抗癌剤の導入、加えて癌細胞への取り込み方法が確立できれば、理想的な抗癌剤の送達システムとなる。さらに、抗癌剤のベシクル(vesicle)への封入が可能になれば、標的臓器・細胞選択性に、しかも正常細胞への影響(副作用)が少ない治療法を確立できる。また、これにより副作用が強く開発を断念した抗癌剤の再評価に結びつくものと考えられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する医薬組成物を完成させることができた。

さらに臨床応用により近い方法として、抗癌剤をウイルスエンベロープベクターに封入し直接腫瘍に導入し、他の抗がん剤との併用により、HVJ-Eのアジュバント作用にも起因する腫瘍細胞特異的な抗腫瘍免疫を惹起でき、腫瘍を退縮させることができた。

【0009】

従って本発明は具体的には、例えば外来遺伝子の封入能を有する不活性化HVJ-Eベクター等の中に、抗癌剤等を封入した医薬組成物を提供するものである。

さらに、腫瘍に抗癌剤を含有したHVJ-Eベクター等を導入し、抗癌剤投与との併用によりベクター自身のアジュバント作用にも起因する高い抗腫瘍免疫を惹起し、腫瘍を退縮させる方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明により副作用が大きな抗癌剤を、簡便しかも安全に癌部に送達できる方法が提供される。

【0011】

本発明において使用される化学療法剤とは、細胞に直接作用する低分子化合物であれば限定されないが、例えば東京化学同人刊・生化学事典第3版には、「現在、選択毒性の高い化学物質を用いる治療法すなわち化学療法の対象は微生物による感染症のみならず悪性腫瘍にまで広げられている。」と記載されており、抗菌剤、抗癌剤等が含まれることは論を待たない。

【0012】

なお本発明においては、化学療法剤としてより好ましくは制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤(以下、抗癌剤と総称)を挙げることができ、抗癌剤としてさらに具体的には例えは、プレオマイシン類、アドリアマイシン(ドキソルビシン)・ダウノマイシン(ダウノルビシン)・アクラルビシン・アムルビシン・イダルビシン・エビルビシン・ピラルビシン・ミトキサントロン等のアントラキノン(アントラサイクリン)系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、イリノテカン等のカンプトテシン類、シスプラチニン類、ストレプトゾシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ピラルビシンおよびそれらの薬理学的に許容される塩を挙げることができる。

【0013】

これら化学療法剤の中でも、さらに好ましくはプレオマイシン類を挙げることができ、具体的にはプレオマイシン(Bleomycin)またはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシン(Peplomycin)またはその薬理学的に許容される塩を挙げることができ、さらに詳しくは塩酸プレオマイシン、硫酸プレオマイシン、硫酸ペプロマイシンを挙げることができる。

【0014】

本発明にかかる医薬組成物を抗癌剤として使用する場合、適応となる癌の種類は限定されず、具体的には固形癌、血液細胞癌等を挙げることができる。これらの中でも固形癌が好適対象である。

【0015】

固形癌としてより具体的には、例えは肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等を挙げることができ、さらに具体的には、例えは消化器癌として胃癌、大腸癌、食道癌等を、頭頸部癌として上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌等を、婦人科領域の癌として子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌等を、泌尿器科領域の癌として前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍、陰茎癌等を挙げることができる。

【0016】

これらの固形癌の中でも、より好適な対象としては、皮膚癌、皮膚悪性腫瘍、頭頸部癌(上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、口腔癌など)、肺癌(特に原発性および転移性扁平上皮癌)、食道癌、悪性リンパ腫(細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病など)、子宮頸癌、神経膠腫、甲状腺癌、前立腺癌、膀胱癌を挙げることができる。

【0017】

次に本発明におけるウイルスエンベロープベクターとは、ウイルスからRNAまたはDNAを取り除いた膜であり、通常は遺伝子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プラスミド等を封入して細胞移入(transfection)に利用されるものである。

【0018】

ウイルスの種類も限定されないが具体的には、例えばレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルベスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスを挙げることができる。

【0019】

本発明にかかるウイルスとしてさらに具体的には、例えばセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルベスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス、インフルエンザウイルス等を挙げることができる。

【0020】

これらの中でも、好ましくはマウス肺炎ウイルスの一つであるセンダイウイルス(Hemagglutinating Virus of Japan、以下 HVJ)を挙げることができる。

【0021】

なおHVJとして具体的には、例えばVR-105、VR-907等をAmerican Type Culture Collection (ATCC。住所: P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, TEL[1]-703-365-2700) から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376,VR-105&text=Sendai&max=20>

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Sendai&max=20>

【0022】

ウイルスエンベロープベクターについてより詳しくは、例えば特開2001-286282号公報(W001/57204号公報)、特開2002-065278号公報、W003/014338号公報等に記載されており、具体的には例えば特開2001-286282号公報の実施例8などに従って調製することができる。

【0023】

なお化学療法剤をウイルスエンベロープベクターに封入する工程においては界面活性剤を使用することが好ましく、界面活性剤として具体的には、例えばトリトン(Triton)X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩等を挙げることができる。デオキシコール酸の塩として好ましくはデオキシコール酸ナトリウム、コール酸の塩として好ましくはコール酸ナトリウムを挙げることができる。

【0024】

本発明にかかる医薬組成物の剤型は限定されないが、具体的には例えば注射剤、軟膏等を挙げることができ、好ましくは注射剤である。

【0025】

続いて不活性化センダイウイルス・エンベロープベクター(以下、HVJ-Eベクター)の場合を例にとって、より詳細に説明する。

【0026】

HVJ-Eベクターに抗癌剤を封入する場合には、抗癌剤を緩衝液に溶解する。ここで使用する緩衝液は限定されず、具体的には例えば、TE緩衝液(10mMトリス、1mM EDTA[pH8.0])、PBS(リン酸緩衝液)等を適宜選択し使用できるが、pHが6-9の緩衝液が好ましい。

【0027】

本発明の特長として、副作用あるいは毒性の強い抗癌剤をHVJ-Eベクターに封入し、*in vitro*実験では培養液中に抗癌剤がもれることなく直接細胞に抗癌剤を送達することができる。

【0028】

また*in vivo*動物実験においては、抗癌剤の全身投与ではなく、局所投与を行うことが可能であり、固体癌の癌細胞のみに効率よく抗癌剤を送達することができる。

【0029】

さらに入人の治療においては、抗癌剤封入HVJ-Eベクターの単独投与による化学療法だけではなく、進行癌患者で抗癌剤の投与不能な患者に対し局所投与を行うことにより癌の退

縮を図り、さらに放射線治療、外科的処理との併用により、一層優れた抗癌効果が得られる。

例えば膀胱癌に対しては、膀胱内注入等の局所投与することもできる。

【0030】

抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターは、*in vitro*実験ではホスト細胞にトランスフェクションする。その場合の手続きは、例えば抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターの溶液を培養細胞の培地に添加するなどの方法を採用することができる。

【0031】

トランスフェクションは37°Cで反応させる場合、30分以上、48時間程度とする。効果判定は生細胞数のカウントあるいはWST assay(生細胞のカウント手法：cell counting kit-8、同仁化学)により行うのが好ましい。

【0032】

*in vivo*動物実験における対象は、例えばマウスの場合、癌細胞が同系移植では免疫不全マウスではない通常マウスを、異種移植の場合はヌードマウスあるいはSCIDマウスを使用するのが好ましい。

【0033】

ペトリディッシュで培養した培養癌細胞をマウスの皮内に移植し、移植細胞が増殖後、抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターを増殖固体癌部内に投与し、癌部の長径および短径を測定し、その抗癌効果測定をするなどの方法を採用することができる。

【0034】

続いて、さらに本発明を詳述する。

近年、悪性腫瘍に対する治療成績は化学療法を中心とする集学的治療の進歩によって著しく向上している。特に白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍においては、造血幹細胞移植などとの併用により治癒も十分に期待できるものとなっている。しかし、抗がん剤や放射線治療などによる毒性効果のみしか認められない場合があり、腫瘍細胞撲滅には限界がある。免疫機構による選択的腫瘍細胞排除が重要であることが基礎的研究ならびに臨床的観察より明らかになってきている。免疫機構は粘膜、非粘膜器官を問わずタンパク質(ペプチド)および糖質、脂質等の非ペプチド抗原を認識して作用する。病原体進入の際、主に単球が進入局所に遊走し、貪食作用などを介して抗原に非特異的な防御応答を行う。糖質や脂質などの非ペプチド等に対する自然免疫がまず惹起され、病原体排除に関する種々の因子の産生を帮助する。その後病原体ペプチドを認識するリンパ球が増殖、分化し、Bリンパ球は抗体産生細胞に分化し、Tリンパ球が免疫系をコントロールするヘルパーT細胞や細胞性障害T細胞などに分化し抗原特異的免疫応答、いわゆる獲得免疫を誘導する。獲得免疫には抗体が主体をなす体液性免疫とTリンパ球が主体となる細胞性免疫がある。免疫が細胞性免疫あるいは体液性免疫のどちらが主導になるかは、ヘルパーT細胞の2つの亜集団である、Th1あるいはTh2のどちらが優位になるかによって決定される。免疫状態がTh1に傾けば細胞性免疫が優位になり、一方Th2に傾けば体液性免疫が優位になる。両者はお互いの免疫バランスの上に成り立っており、これら免疫状態は種々の細胞が分泌する液性分子であるサイトカインに依存している。Th1型サイトカインとしてIL-12、IFN γ などが、一方Th2型サイトカインとして、IL-4、IL-5などが挙げられる。

【0035】

免疫、特に腫瘍免疫を考える場合には、CD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)およびCD4陽性ヘルパーT細胞が非常に重要な役割を果たしていることが報告(North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991, Pardoll DM. 1998)されている。特に免疫された動物のCD8陽性T細胞(CTL)は、*in vitro*で直接標的細胞を障害し(Wanger H. 1980)、養子免疫による非免疫動物に腫瘍抵抗性を持たせることができた(North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991)との報告がなされている。したがって、腫瘍特異的CTLをいかに効率よく誘導できるかが抗腫瘍療法の開発において重要である。CTLによる抗腫瘍免疫はT細胞レセプターを介して、腫瘍細胞表面に発現された主要組織抗原(major histocompatibility complex: MHC)クラスI分子と腫瘍抗原由来ペプチドの複合体をCTLが認識し、バフォーリン等を腫瘍細胞に導入するこ

とによって細胞障害性を発揮する。腫瘍特異的CTL誘導には、まず腫瘍細胞特異的に発現され、細胞内でプロセスされてペプチド断片としてMHCに提示されうる標的抗原ペプチドを同定することに主眼が置かれ、Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Library (SEREX)法により高力値のIgG抗体を産生する多くのペプチド分子が見出されている。

【0036】

しかし、腫瘍ペプチドの同定のみで腫瘍免疫を語ることは困難である。同定されたペプチドをin vivoで細胞表面上に如何に効率よく提示させるかという点、co-stimulatory moleculeであるCD80/CD86の発現など、残されている課題は多い。詳述すれば、効率的に当該ペプチドを発現させてもco-stimulatory moleculeであるCD80/CD86などの発現が低く、抗原シグナルのみが伝わった場合は抗原特異的T細胞の増殖をきたさないばかりか、その抗原を発現する細胞に対するT細胞anergyに陥るとされている(Gribben JG. 1996)。白血病細胞においては、その増殖優位性を獲得する機序として多くの遺伝子異常が明らかになっており、このような遺伝子異常に形成された特異的異常タンパク質が発現し、プロセス断片化されたペプチドは細胞表面上MHCの溝に提示されると考えられている。しかし、多くの白血病細胞はこのような白血病特異的抗原を発現しているにも拘らず、その表面におけるCD80/CD86などのco-stimulatory moleculeの発現が不全なことから、白血病に対する有効な免疫反応を惹起することが難しいことが報告されている(Hirano N. 1996)。

【0037】

また、最近の知見としてCTLの上昇は認められるが腫瘍拒絶が起こらない理由として、腫瘍近傍に存在しているstroma細胞(乳がん、すい臓がん、胃がんの腫瘍組織の90%以上が間質線維芽細胞よりなる)により、免疫細胞、炎症細胞の浸潤の妨げになっており、これらの障害を取り除くことにより腫瘍細胞の退縮効果が飛躍的な上昇したことが報告されており(Yu P. 2004)、腫瘍細胞への炎症細胞、免疫細胞の浸潤が腫瘍退縮に関しては重要な要因として考えられるようになってきている。

以上より腫瘍免疫を上手く利用するためには、腫瘍特異的なCTLを如何に効率よく惹起させることができるかにかかっており、その問題点として、以下の点が挙げられる。

- ・腫瘍特異的抗原が同定されているか
- ・腫瘍特異的抗原が同定されてない場合はどうするか
- ・免疫惹起細胞(樹状細胞など)に如何に効率よく抗原提示をさせるか
- ・免疫惹起細胞(樹状細胞など)の成熟を如何に効率よく図るか
- ・以上踏まえた上で如何に腫瘍免疫(CTLを中心とした)を惹起させるか
- ・免疫細胞の腫瘍組織効率的な浸潤

【0038】

【特許文献1】特開2001-302541号公報

【0039】

【特許文献2】特開2002-65278号公報

【0040】

【非特許文献1】Anticancer Res., (19):5367-5374. 1999, Ishida H., Kaneda Y., et al.

【0041】

【非特許文献2】Hum. Gene. Ther., (10):2719-2724. 1999, Zhou WZ., Hoon DSB., et al.

【0042】

【非特許文献3】Gene. Ther., (6):1768-1773. 1999, Zhou WZ., Kaneda Y., et al

【0043】

【非特許文献4】Mol. Ther., (5):291-299. 2002, Tanaka M., Kaneda Y., et al.

【0044】

上記記載のなかで、腫瘍免疫(CTLを中心とした)を惹起させるかが最も重要な要件であ

りCTLの誘導には免疫惹起を誘発させるアジュバントが必要である。免疫状態をTh1にシフトできうるアンジュバンドとして「HVJ-電荷型リボソームからなるアジュバント」としての特許公開がされている(特開2001-302541号公報)。その腫瘍ワクチンとしての効果についても報告がなされている(Ishada H. 1999, Zhou WZ. 1999, Tanaka M. 2002)。HVJ-EはHVJをもとの構築されたベクターであり(特開2002-65278号公報)、ベクタービヒクルの中にプラスミド、オリゴDNA・RNA、タンパク質、ペプチド、低分子化合物を封入でき、in vitroおよびin vivoにおいて当該封入試料をベクタービヒクル近傍の細胞へ導入でき、またエンベロープタンパク質であるFタンパク質の働きにより細胞同士を融合させることができある。本発明者らは、上記利点を利用してHVJ-Eを用いた腫瘍免疫について検討を行った。

【0045】

癌の転移の抑制や再発の防止に最も適した遺伝子治療法は免疫遺伝子治療であるが、その効果は世界的にまだ十分に上がっていない。その原因のひとつとしては腫瘍免疫を治療に十分な程度に増強できないことが推察される。我々はこの課題を実現するために遺伝子導入ベクターや遺伝子発現方法の開発を行ってきた。その結果、不活性化HVJのアジュバント作用と抗がん剤を当該ベクターに封入し固体腫瘍に直接投与し、他の抗がん剤の併用投与により腫瘍特異的な抗腫瘍免疫を惹起させることができた。その際腫瘍特異的抗原ペプチドを必要としない、換言すれば腫瘍ペプチドが同定されていない広範な腫瘍に応用可能である。さらにCTLが惹起されているにもかかわらず、固体腫瘍組織を取り巻くstroma細胞等により腫瘍部位にCTL細胞が到達することができず、固体腫瘍の腫瘍細胞を殺傷できないことによって、腫瘍退縮が認められないという局面をHVJ-Eと抗がん剤との併用により打破することができるという画期的な発明である。

【0046】

本発明の要点は3つある。

1つはHVJの使用である。HVJのアジュバント効果によって免疫状態をTh1へシフトさせ腫瘍免疫の惹起を誘導させることである。

【0047】

2点目としてHVJ-Eを用いた腫瘍免疫を惹起させるために、全身投与したシスプラチニ(DDP、ランダ注：日本化薬)とHVJ-Eにブレオマイシン(塩酸ブレオマイシン、ブレオ注射用：日本化薬)をHVJ-Eベクターに封入し移植した腫瘍組織中に導入し、効率的な腫瘍免疫を惹起させることができた点にある。

【0048】

さらに3点目として、惹起されたCTL細胞を非常に効率よく固体腫瘍中に集積できることが挙げられる。

また、誘導された腫瘍免疫は同種腫瘍細胞を排除するとう免疫本来の働きも保持しており、当該作用により転移した腫瘍の排除、さらには固体腫瘍を外科的に排除するために前もって当該処置をすることにより外科手術後の転移を防ぐ、そして腫瘍近傍転移リンパ節への転移腫瘍を殺傷し、外科的処理による除去部分を極力小さくするというような、いわゆるネオアジュバントとしての利用可能性を示した点にある。

【発明の効果】

【0049】

本発明の実施により、わが国で急速に増加しつつある肺癌、乳癌、胃癌・大腸癌・食道癌などの消化器癌、頭頸部癌(上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌など)、婦人科領域の癌(子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌など)、泌尿器科領域の癌(前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎孟・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍、陰茎癌など)、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等すべての固体癌への新たな化学療法が、HVJ-Eベクターを用いることにより可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0050】

続いて、本発明による免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化

学療法剤を有効成分として含有する医薬組成物が有する優れた効果、特にウイルスエンベロープベクターのウイルスエンベロープ糖タンパク質等によるアジュバントによる優れた効果を示すため、具体的な実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【実施例 1】

【0051】

(1) 試験デザイン

8週齢のBALB/cAnNCrl系雄マウスの背部皮内に、マウス大腸癌由来のCT-26細胞(5×10^6 細胞)を移植し、担がんマウスを作製した。移植5日後に腫瘍径(長径)が5mm程度に達した動物の腹腔内に0.2mg/bodyのプラトシン注(シスプラチニン、CDDP)を投与した。投与日後に、単回(投与翌日)あるいは複数回(3回:投与1, 5, 8日後)、抗がん剤(塩酸ブレオマイシン[BLM]:日本化薬)含/不含HVJ-E等を腫瘍内に投与した。腫瘍径、生存曲線、腫瘍組織における免疫反応について検討した。

さらに担がんマウスに当該処置を施したマウスに、CT-26細胞あるいは同系マウス由来Meth-A細胞を移植し移植細胞の動態を観察した。

【0052】

(試験1.)以下記載の群設定を行い、移植腫瘍における当該処置の抗腫瘍効果について検討した。

モデル設定として、(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与の各群を設定し、それについて検討した場合の21日後の腫瘍容量の測定を行い抗腫瘍効果に及ぼす影響を調べた。

当該群構成および投与用量等について以下に詳細した。

【0053】

群	被験物質 腹腔内投与 (mg/body)*	被験物質 腫瘍内投与 (μg/腫瘍)**
対照群	生理食塩液 0	生理食塩液 0
HVJ-E群	生理食塩液 0	HVJ-E 0
6.5 μg/tumor BLM群	生理食塩液 0	BLM 6.5
6.5 μg/tumor HVJ-E/BLM群	生理食塩液 0	HVJ-E/BLM 6.5
0.2mg/body CDDP群	CDDP 0.2	生理食塩液 0
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor		
HVJ-E/BLM群	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5

*: シスプラチニン(CDDP)として

**: ブレオマイシン(BLM)として

【0054】

(試験.2) 試験1においてした場合の当該CDDP HVJ-E/BLM単回投与(単回)処置における抗腫瘍効果の更なる増強を鑑み、HVJ-E/BLMの複数回(3回)投与を行った(試験.2-1)。さらに当該試験において抗腫瘍免疫により腫瘍の退縮が起こった場合、当該惹起免疫の種類の推定を行うため、腫瘍細胞(CT26細胞(試験.2-2)およびBALB/cマウス肉腫細胞であるMeth-A細胞(試験.2-3))の再投与を行い、当該移植細胞の生着、腫瘍用量の増減について調べた。

【0055】

(試験.2-1)

(1) 対照群、(2)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群(単回)、(3)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群の21日の腫瘍容量について検討を行った。

【0056】

群	腹腔内投与 (mg/body)*	腫瘍内投与 (μg/腫瘍)**
対照群	生理食塩液 0	生理食塩液 0
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5
HVJ-E/BLM投与群		
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5×3
3回HVJ-E/BLM投与群		

*: シスプラチニ (CDDP) として

**: ブレオマイシン (BLM) として

【0057】

(試験、2-2)

細胞の再移植を行なう前までは上記試験と同様の処置を実施し、CDDPの投与15日後に初回腫瘍細胞移植隣接部にCT-26細胞およびMeth-A細胞 (5×10^6 個細胞) をそれぞれ皮内に移植し、再移植細胞に拒絶について調べた。

【0058】

群	再投与細胞	
	CT-26	MethA
対照群1 (初発CT26投与あり)	○	○
対照群2 (初発CT26投与なし)	○	
初発0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	○	
HVJ-E/BLM投与群		
初発0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	○	○
3回HVJ-E/BLM投与群		

【0059】

(試験、3) 試験2の結果を補足する試験として、直接BLMを腫瘍内に封入量と同等量換算のBLMを投与しその効果についての検討を行った。

群	腹腔内投与 (mg/body)*	腫瘍内投与 (μg/腫瘍)**
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5×3
3回HVJ-E/BLM投与群		
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP 0.2	6.5×3
3回BLMのみ投与		

*: シスプラチニ (CDDP) として

**: ブレオマイシン (BLM) として

【0060】

(試験、4) CTL assay

当該試験においてした抗腫瘍免疫効果が、CT26細胞特異的な抗腫瘍免疫の惹起においてされているかどうかの検討を行うため、動物より回収した脾臓細胞をCT26細胞で刺激し、放射ラベルしたクロムを用いたCTL assayを行い、CT26特異的な抗腫瘍免疫が惹起されているかについて検討した。

係る試験において、(1) CT-26細胞未接種群、(2) CT-26細胞のみ接種群、(3) CT-26細胞

接種+CDDP投与群、(4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与群をそれぞれ作製し試験に供した。

【0061】

(試験、5)当該抗腫瘍免疫による抗腫瘍効果についての試験においてした腫瘍組織におけるCD-4、CD-8、好中球、マクロファージ等の浸潤を調べるために示す試験群を設定し、CDDP投与9日後の腫瘍組織を摘出し、組織免疫染色を行った。

群	腹腔内投与 (mg/body)*	腫瘍内投与 (μg/腫瘍)**
対照群	生理食塩液 0	生理食塩液 0
HVJ-E投与群	生理食塩液 0	HVJ-E 0
6.5 μg/tumor BLMのみ投与群	生理食塩液 0	BLM 6.5
6.5 μg/tumor HVJ-E/BLM投与群	生理食塩液 0	HVJ-E/BLM 6.5
0.2mg/body CDDP投与群	CDDP 0.2	生理食塩液 0
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5
HVJ-E/BLM投与群		
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5×3
3回HVJ-E/BLM投与群		

【0062】

(2) 実験方法

2-1) 腫瘍細胞の培養

BALB/cマウス大腸ガン由来CT-26細胞を、10%FBS含有DMEM培地を用い、37°C、5%CO₂存在下で培養した。

75cm²のフラスコを用いて細胞培養を行った。約80%コンフルエントに達した後、継代培養を行った。DMEM(10%FBS含有)液を除去後、10mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を洗浄し、1mLの0.25%トリプシンおよび1mmol/L EDTA-2Na含有PBSを添加し、37°Cで細胞を剥離した。9mLのDMEM培地を添加後、細胞を集め、遠心分離(1000rpm、5分間)にて細胞を回収した。上清除去後、10%FBS含有DMEM培地にて細胞を希釈し、培養した。

BALB/cマウスMeth-A細胞は10%FBS含有DMEM培地を用い、37°C、5%CO₂存在下で培養した。

【0063】

2-2) 腫瘍細胞懸濁液の調製

約80%コンフルエントに達した細胞の培養液を除去後、PBSを用いて、培養フラスコを洗浄した。0.25%トリプシンおよび1mmol/L EDTA-2Na含有PBSを少量添加し、37°Cで細胞を剥離し始めるまで放置した。DMEM培地を用いて細胞を集め、遠心分離(1000rpm、5分間)した。上清を除去後、PBSに懸濁した。再度遠心分離(1000rpm、5分間)し、上清を除去後、PBSを用いて5×10⁷個/mLに調製した。

【0064】

2-3) マウスの馴化

16日間の検疫馴化期間中、固型飼料および飲水を自由に与えた。

【0065】

2-4) 腫瘍細胞の接種

検疫馴化が終了した動物にバリカンを用いて剃毛を実施した。マウスの背部に、ディスポーザブル注射筒および注射針(26G)を用いて、100 μL/site(5×10⁶個/body)を59匹の動物に皮内投与した。投与した翌日に57匹の動物(未投与動物)に同様に投与した。

【0066】

2-5) 動物の群分け

腫瘍の径(長径、短径)を、移植後 5日目に測定(群分け後は測定しなかった)した。5日

後に腫瘍径(長径)が5mm程度になった動物を、平均腫瘍径(長径)がほぼ均一になるよう、層別無作為化によって群分けした。

【0067】

2-6) 投与

ディスポーザブル注射筒および注射針を用いて、CDDP投与群については1回腹腔内投与(1000μl)した。腫瘍内試料投与群においては、CDDP投与日後に所望試料を腫瘍内に投与(100μl)した。

【0068】

2-7) 腫瘍径の測定

投与日を投与後0日とした。投与後3, 6, 9, 12, 15, 18および21日に、全例について腫瘍径を計測し、腫瘍体積(長径×短径×短径÷2)を算出した。

CT-26細胞およびMeth-A細胞の再投与においても再投与後の腫瘍径を測定した。

【0069】

2-8) CTL assay

麻酔下の動物より脾臓を取り出し、3mlのRPMI溶液の入った6cm径ペトリディッシュに回収した。滅菌した2枚のスライドガラスのすり部分で脾臓組織をすりつぶし、極力皮膜より脾臓細胞を分離し、残渣はメッシュにより除去した。7mlのPRMI溶液を加えて1200rpm、10分間遠心し上清を除去した。さらに10mlのRPMI溶液を加えて洗浄した。再度洗浄操作を行い、当該操作により得られた細胞を5mlのGIT(10%FCS及び抗生素含有)溶液に懸濁した。該操作で得られた細胞の数を測定した。当該細胞を 5×10^6 細胞/mlに調整し、12well plateに2ml/wellとなるように細胞を撒種した。当該wellに刺激細胞としてCT-26細胞を添加した。当該刺激細胞の作製は、 1×10^7 細胞/mlに調整した刺激細胞含有GIT溶液に100μlのマイトマイシンCを添加し1時間、37℃にて処理した。該処理後9mlのGIT溶液を加え、1000rpm、5分間遠心し、上清を除去後、10mlのGIT溶液を加えて洗浄操作を行い、当該操作をさらにもう一度行い、最後に1mlのGIT溶液に細胞を懸濁することにより調整した。当該細胞を細胞密度がGIT溶液を添加することにより、 2.5×10^5 細胞/mlになるように調整し、前述の脾臓組織より回収した細胞懸濁液中に該溶液2mlを添加した。

刺激細胞なし試料ではGIT溶液のみを2mlを添加した。当該試料を6日間培養した。CTL assayにおいては当該細胞をターゲットとして使用した。

該組織より回収した脾臓細胞の培養試料を用いてCTL assayを行った。まずターゲット細胞として使用するCT-26細胞の調整を以下のように行った。CT-26細胞を 1×10^7 細胞/ml(GIT培地中)となるよう調整し150μlを取り、該溶液に1mCi/mlの放射ラベルしたCr溶液150μlを加え、1時間37℃にて培養した。10mlのGIT溶液を加えて細胞を洗浄し、1000rpm、5分間遠心し細胞を回収した。上清を除去し10mlのGIT溶液を加えて洗浄した。都合3回同操作を行い洗浄を行った。当該操作により得られた細胞を150μlのGIT溶液に懸濁し、最後に100倍希釈し 1×10^5 細胞/mlとなるよう調整し、ターゲット細胞(T)として以下の操作に用いた。

エフェクター細胞(E)は方法の部分で示した4群からの処理した細胞を回収し、調整し用いた。

実際のCTL assayは、エフェクター細胞(E)とターゲット細胞(T)との比、E/T比がそれぞれ80、40、20、10、5にし測定を行った。この際、ターゲット細胞は100μl(1×10^5 細胞/ml)を加え、全量が200μlとした。当該試料を4時間37℃で処理した。

培養終了後、遠心により細胞および残渣を除去し、100μlを回収し、γ-カウンターに入れ計測した。以下の式により% specific Cr releaseを算出した。

$$\% \text{ specific Cr release} = b - c / (a - c) * 100 \quad (\%)$$

a: maximum release (cpm)

b: experimental release (cpm)

c: spontaneous release (cpm)

【0070】

2-9) 当該腫瘍組織は腫瘍組織染色を行うために液体窒素中で凍結した。腫瘍組織をクラ

イオスタッフで $8\mu\text{m}$ 厚切片を作製した。組織切片を -20°C の冷アセトン中で15分間固定した。水洗後内因性アビシン・ビオチンのブロッキングを行い水洗した。試料を正常ウサギ血清により反応を行い、50倍希釈した一次抗体（抗マウスCD8a・ラット抗体（Ly-Z; Pharmingen）、抗マウスCD4a・ラット抗体（L3T4; Pharmingen））と 4°C 、一晩反応させた。 7.5mM トリス緩衝液（pH7.5）で洗浄後、300倍希釈した抗ラット・ビオチン標識ウサギIg（DAKO）と30分間反応させた。 9.5mM トリス緩衝液（pH7.5）で洗浄後、100倍希釈のストレプトアビシンと30分間反応させた。 11.5mM トリス緩衝液（pH7.5）で洗浄後、ファーストレッドにより発色させた。水洗後ヘマトキシリンで核染色を行った。

【0071】

結果

試験1の結果

(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群の腫瘍容量を測定した。

試験は各群合計10匹とし5匹づつ2回に分けて試験を行った。当該試験において特筆すべきことは(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群において了当該試験動物10匹のうち2匹のマウスにおいて外見上移植した腫瘍細胞が消え、観察したことである。2回試験した内1の試験において了5匹の動物の腫瘍容量の平均値をグラフに示した。それぞれの平均腫瘍容量は、(1)対照群： 1641mm^3 、(2)HVJ-E群： 1386mm^3 、(3)BLMのみ群： 1303mm^3 、(4)HVJ-E/BLM群： 718mm^3 、(5)CDDPのみ群： 387mm^3 、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群： 51mm^3 となった。対照群の平均腫瘍容量を100%とし、各群の平均値を比較すると、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群はそれぞれ、82.9%、80.0%、43.0%、23.2%、3.1%となった(図1)。

【0072】

試験2-1の結果

(1)対照群、(2)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群、(3)CDDP+HVJ-E/BLM3回投与群(CDDP投与後のHVJ-E/BLM投与日、1, 5, 8日後)モデルを作製し、当該(2)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群と(3)CDDP+HVJ-E/BLM3回投与群における腫瘍拒絶について効果を調べた。

まず図に示すように、(2)群で4匹中1匹のマウスで観察が認められた。(3)群では5匹中4匹で観察が認められた。(図2)

【0073】

試験2-2および2-3の結果

試験2-2でした同系腫瘍細胞(CT-26細胞)再投与試験において、CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群で4匹中1匹のマウスで観察し、当該マウスにおいて了CT-26細胞の再接種動物は移植細胞を拒絶した。しかし、残りの3匹において初発腫瘍細胞は拒絶されておらず、当該動物にCT-26細胞を移植した動物ではCT-26細胞の再移植後に該細胞を拒絶することはできなかった。一方CDDP+HVJ-E/BLM3回投与群では5匹中4匹で拒絶が認められた。以上の結果より、腫瘍免疫が惹起されていることが確認された(図3)。当該腫瘍免疫がCT-26細胞特異的であるかについては次試験により判定した。

試験2-3でした試験においてはCDDP+HVJ-E/BLM3回投与により観察したマウスに移植したMeth-A細胞を拒絶することはできなかった(図4)。

【0074】

試験3の結果

今までにした試験において当該CDDP+HVJ-E/BLMにおいて抗腫瘍効果が認められた。しかし、この際のBLMの効果について、HVJ-Eの有無、すなわちBLMのHVJ-Eへ封入の効果(HVJのアジュバント効果も含めて)が検討をしておらず、今回CDDP併用時における当該効果について検討した。その結果を図5に示した。図から明らかのように、BLMをHVJ-Eに未封入の場合において了試験では当該処理において腫瘍の退縮効果はBLMをHVJ-Eに封入した場合に比べて全く上がらず、腫瘍を退縮させることはできなかった。CDDP併用時においてBLMを腫瘍組織直接導入する際にも、BLMをHVJ-Eに封入し腫瘍組織に導入しなければ腫瘍を退縮させる効果が認められないことが判明した。

【0075】

試験4の結果

試験1および2においてした試験結果において、CDDPの全身投与とBLMをHVJ-Eに封入し腫瘍組織に直接投与することにより、以下の点が明らかになった。

- ・腫瘍組織を退縮させることができること
- ・その効果はBLMをHVJ-Eに封入した試料を複数回投与して効果があがること
- ・当該処理において移植細胞を退縮した寛解したマウスに同細胞を再移植した動物では当該細胞を拒絶したこと
- ・しかし、当該寛解マウスに同系異種細胞を移植した場合には拒絶することができなかつたこと

【0076】

よって当該試験において移植細胞に特異的な免疫が誘導されることが推定されたが、さらに直接的な特異的免疫の誘導を調べるためにCT-26細胞に特異的な免疫が誘導されているかどうかについて検討した。

(1) CT-26細胞未接種群、(2) CT-26細胞のみ接種群、(3) CT-26細胞接種+CDDP投与群、(4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与群を設定、CTL assayを行いCT-26細胞に特異的なCTLについて検討した。エフェクター細胞(E)とターゲット細胞(T)との比、E/T比を変化させ、% specific Cr release によりCTLの誘導を調べた。結果図6よりET比を80としたとき、(1) CT-26細胞未接種群：8.1%、(2) CT-26細胞のみ接種群：8.1%、(3) CT-26細胞接種+CDDP投与群：12.9%、(4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与群：33.5%となつた。

以上の結果より(4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与においてCT-26細胞に特異的なCTLの誘導が起こっていることが判明した。

【0077】

試験5の結果

(1) 対照群、(2) HVJ-E群、(3) BLMのみ群、(4) HVJ-E/BLM群、(5) CDDPのみ群、(6) CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群、(7) CDDP、HVJ-E/BLM3回投与群を設定し、CDDP投与9日後の当該動物より腫瘍組織を採取し、当該組織の切片をそれぞれ作製した。まず、HE染色(図7,8)および抗CD-4抗体および抗CD-8抗体特異的免疫組織染色(データは示さず)より当該組織において認められる特徴的な病理所見を記載する。(1) 対照群においては核分裂を呈している細胞が多く、また核密度が高いという腫瘍細胞に特異的な悪性細胞所見が認められた。腫瘍組織の中心部ではネクロティックな細胞死が認められた。大半がsarcoma細胞特有の形態、つまりCT-26細胞の旺盛な増殖像が認められた。CD-4およびCD-8(図9,10)陽性像はほとんど見られなかった。(2) HVJ-E群においても総体的に(1) 対照群とほぼ同じであり、HVJ-Eを投与した針跡近傍で好中球の浸潤が認められた。(3) BLMのみ群、(4) HVJ-E/BLM群においても、ほぼ同様の所見であった。

【0078】

前者に比べて(5) CDDPのみ群では、腫瘍組織の広範にわたって腫瘍細胞の壊死像が認められた。これは腹腔内投与したCDDPが血管等を通じて腫瘍組織に広かり、CDDPの抗がん剤としての効果により腫瘍細胞を排除していると考えられた。しかし、CDDPのみの投与ではまだ腫瘍細胞を壊滅させることはできず、腫瘍細胞の残存が認められ、当該細胞によりCDDP投与9日後の腫瘍増殖が認められたものと推察された。(6) CDDP HVJ-E/BLM単回投与群では、総体的に腫瘍細胞が少なくなり、かなりの腫瘍細胞は消滅している。本試料の回収日はCDDP投与9日目であり、まだ寛解状態に至っておらず、本試料が寛解できるかどうかは不明である。ただ、CD-4およびCD-8陽性細胞数(図9,10)は増加しているが、後述のHVJ-E/BLMの連続投与に比べると少ない。(3) CDDP HVJ-E/BLM3回投与群では、腫瘍細胞はほとんど/全く認められず、抗原線維が変性壊死を起こし液状状態の部位が認められた。総体的に細胞数が少なく、広範に好中球の浸潤が認められた。特徴的なことは、他組織ではそれほど認められることのなかった、抗CD-4抗体および抗CD-8抗体陽性細胞(図9,10)が広範に認められたことが特徴として挙げられる。腫瘍組織に浸潤する抗CD-8抗体に対する

る陽性細胞のほとんどはCTL細胞であることが報告されており、(3) CDDP HVJ-E/BLM3回投与群で、腫瘍の対解は試験4の結果と合わせてCTLによるものであると予想された。

【0079】

本実施例では(1)樹状細胞によるワクチン効果がCpG-ODNを添加することにより上昇した点、と(2)HVJ-E/BLMの腫瘍内投与とCDDPの全身投与の相乗効果により抗腫瘍免疫が惹起されたことが示された。

また本発明の特徴として、以下を挙げることができる。

- ・腫瘍の対解が認められた。
- ・対解の理由の一つとして、CD-8陽性細胞の腫瘍組織への浸潤、つまり腫瘍細胞特異的なCTLによる効果が考えられる。
- ・HVJ-E/BLMあるいはCDDP単独投与のみでは効率のよい腫瘍免疫が惹起できないことから併用が重要である。
- ・CDDP投与でCDDPの効果は弱いながらも腫瘍組織全体に行き渡り、その後のHVJ-E/BLM投与により、CDDPにより脆弱となった腫瘍組織にHVJ-E/BLMが効率よく送達されその効果を発揮した。
- ・その際、HVJ-Eは腫瘍免疫を惹起するアジュバントとして作用する。

【0080】

免疫染色図の説明

図7および8のHE染色図に対する説明

ControlではCT-26がん細胞の、核密度が高い、hyper chromatin、核の大きさの不揃い、核分裂が多い等の悪性所見像が認められる。この現象はHVJ-E、BLM、HVJ-E/BLM投与時にも多少の差はあるが同様の所見が認められた。壊死部分での好中球、マクロファージの浸潤像が認められた。CDDP投与の試料では空胞変性が認められ好中球、マクロファージ等ががん細胞中に浸潤しており、係る細胞ががん細胞を取り囲んでいる様子が見受けられる。CDDP+HVJ-E/BLMの単回投与では、腫瘍細胞数が少くなり、リンパ系細胞が多く認められる。HE染色の濃さが薄くなり、よりピンクな像となっている。これは細胞中の核酸濃度が低下している証拠であり、がん細胞の細胞密度が低下していることによるものであると考えられる。CDDP+HVJ-E/BLMの3回投与では、ほとんどがん細胞が認められず、あっても分裂像は少なく増殖性を失っている。変性壊死している部分が多く炎症性細胞の浸潤も広範囲に認められ、リンパ球系細胞も多く認められた。

【実施例2】

【0081】

(1) 試験デザイン

MB49細胞接種マウスモデル

本実験モデルは、例えばAnticancer Res., 2004, 24(4):2225-30. などに記載された方法に従って作成することができる。

具体的には、 2×10^6 個のMB49細胞をB6マウスの背部皮内に接種し、5日間放置し腫瘍径が7-8mmになった動物の腫瘍内に、G1～G6各群それぞれのサンプルを3回接種し効果を検討した。

G1: 生理食塩水(コントロール)

G2: アドリアマイシン(ADM) $20 \mu\text{g}$

G3: ADM $100 \mu\text{g}$

G4: ADM $20 \mu\text{g}$ +HVJ-E 5000HAU

G5: ADM $100 \mu\text{g}$ +HVJ-E 5000HAU

G6: HVJ-E 5000HAU

【0082】

(2) 結果

以下に、各群の腫瘍容量(mm^3)の経時変化を示す。(図11参照)

群	G1	G2	G3	G4	G5	G6
---	----	----	----	----	----	----

Day 0	120	128.4	119	125.3	117.6	120.5
5	351.1	303.2	285.8	266.6	199.1	423.6
7	442.5	330	291.2	190.6	152.6	734.1
9	717.6	324.9	333.9	267.5	151.6	904.8
12	1188.79	331.74	426.88	333.01	217.84	1510.1
15	2040.38	443.36	450.76	450.76	391.22	2223.65
19	2851.36	773.88	989.52	737.22	287.96	4587.2
21	3876.85	1022.48	1220.44	976.75	490.76	3279.72

【0083】

本実施例では、細胞増殖度が非常に高いMB49細胞を皮内投与し、しかも腫瘍径が7-8mmというかなり大きな腫瘍において消失(eradication)が起こるかどうかが注目点であった。

結果として、ADM単独でも腫瘍抑制効果が認められたが、消失は認められなかった。

一方、ADM 100μg+HVJ-E 5000HAU投与群の3匹の動物のうち1匹については、腫瘍の消失が認められた。

これより、HVJ-EとADMによるMB49細胞に対する抗腫瘍効果を示す結果が得られた。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】各群の腫瘍容量を比較したグラフである。

【図2】CDDPとHVJ-E/BLMの単回および複数回投与の抗腫瘍効果を比較したグラフである。

【図3】同系腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。

再投与は15日に行ったものである。

【図4】同系異腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。

再投与は0日に行ったものである。

【図5】CDDPとBLMをHVJ-Eへの封入の有無についてした場合の抗腫瘍効果を比較したグラフである。

【図6】CTL assayによるCTLの誘導をみたグラフである。

【図7】各腫瘍組織切片のHE染色図である。(1)対照群[右上]、(2)HVJ-E群[右下]、(3)BLMのみ群[左上]、(4)HVJ-E/BLM群[左下]における、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色図である。

【図8】(5)CDDPのみ群[右上]、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群[右下]、(7)CDDP+HVJ-E/BLM連続投与群[左上]における、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色図である。

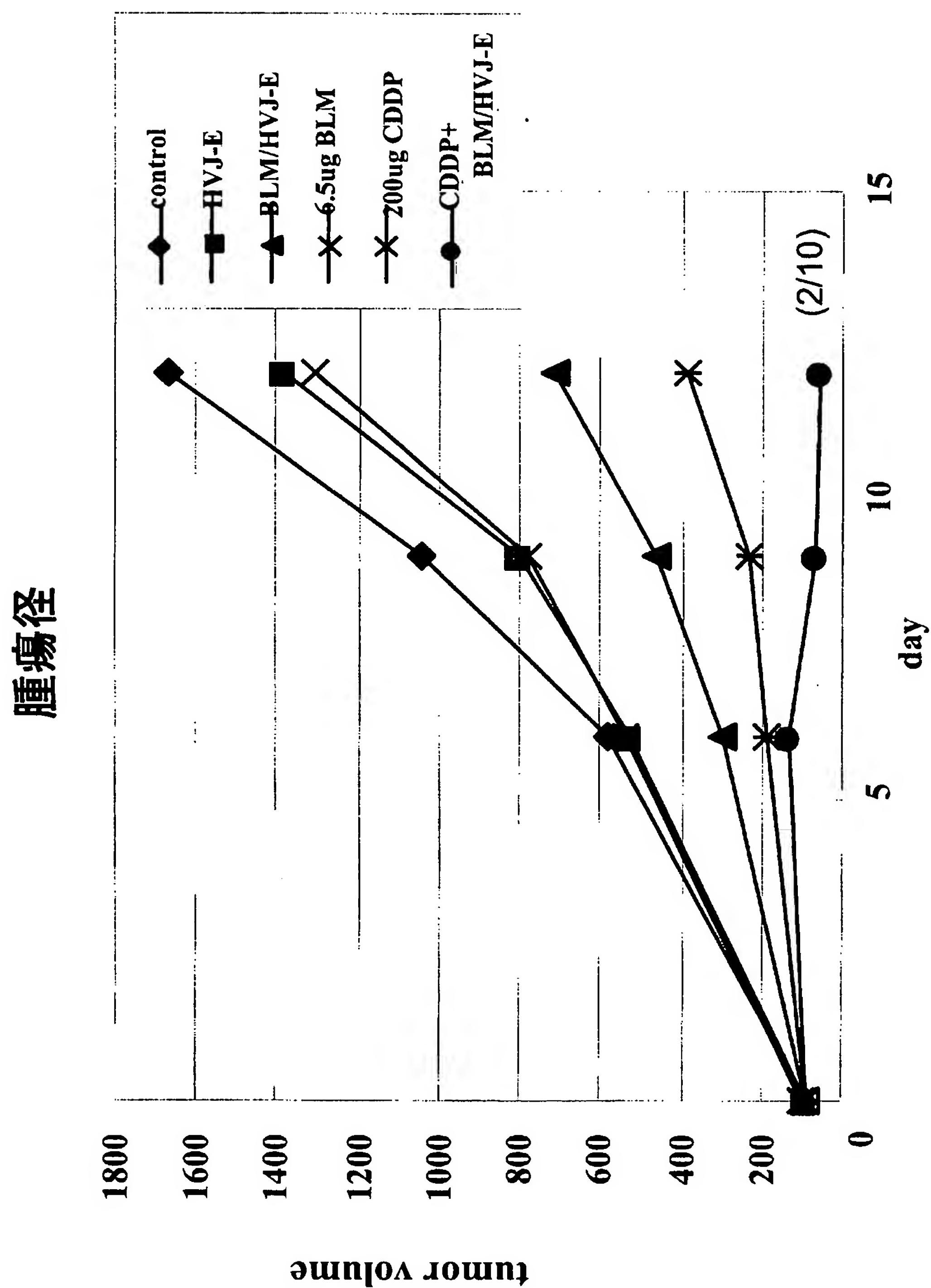
【図9】各群におけるCD-4陽性像を比較したグラフである。

【図10】各群におけるCD-8陽性像を比較したグラフである。

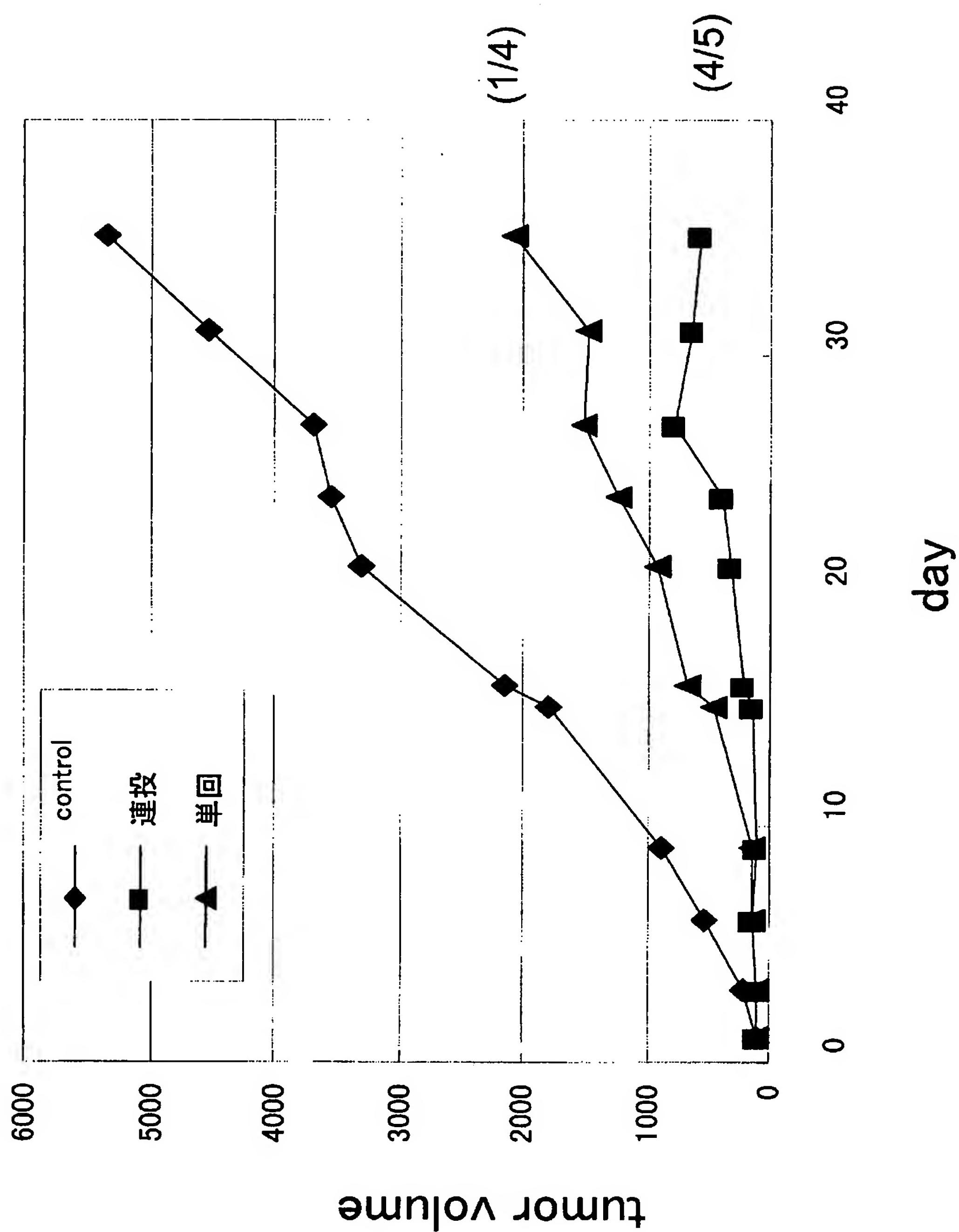
【図11】膀胱癌細胞接種マウスモデルにおける腫瘍容量の変化を、群間比較したグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図2】



〔図3〕

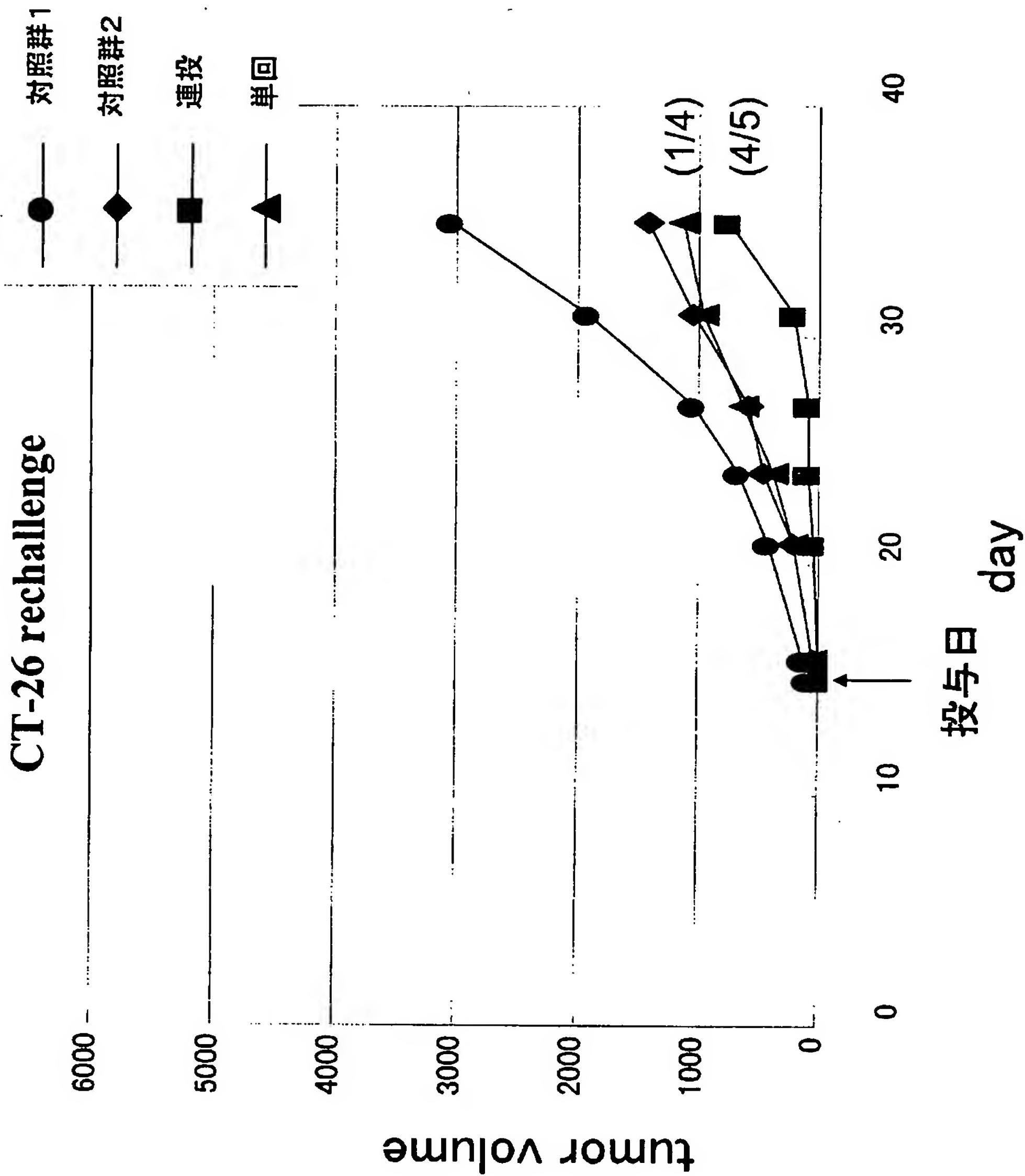
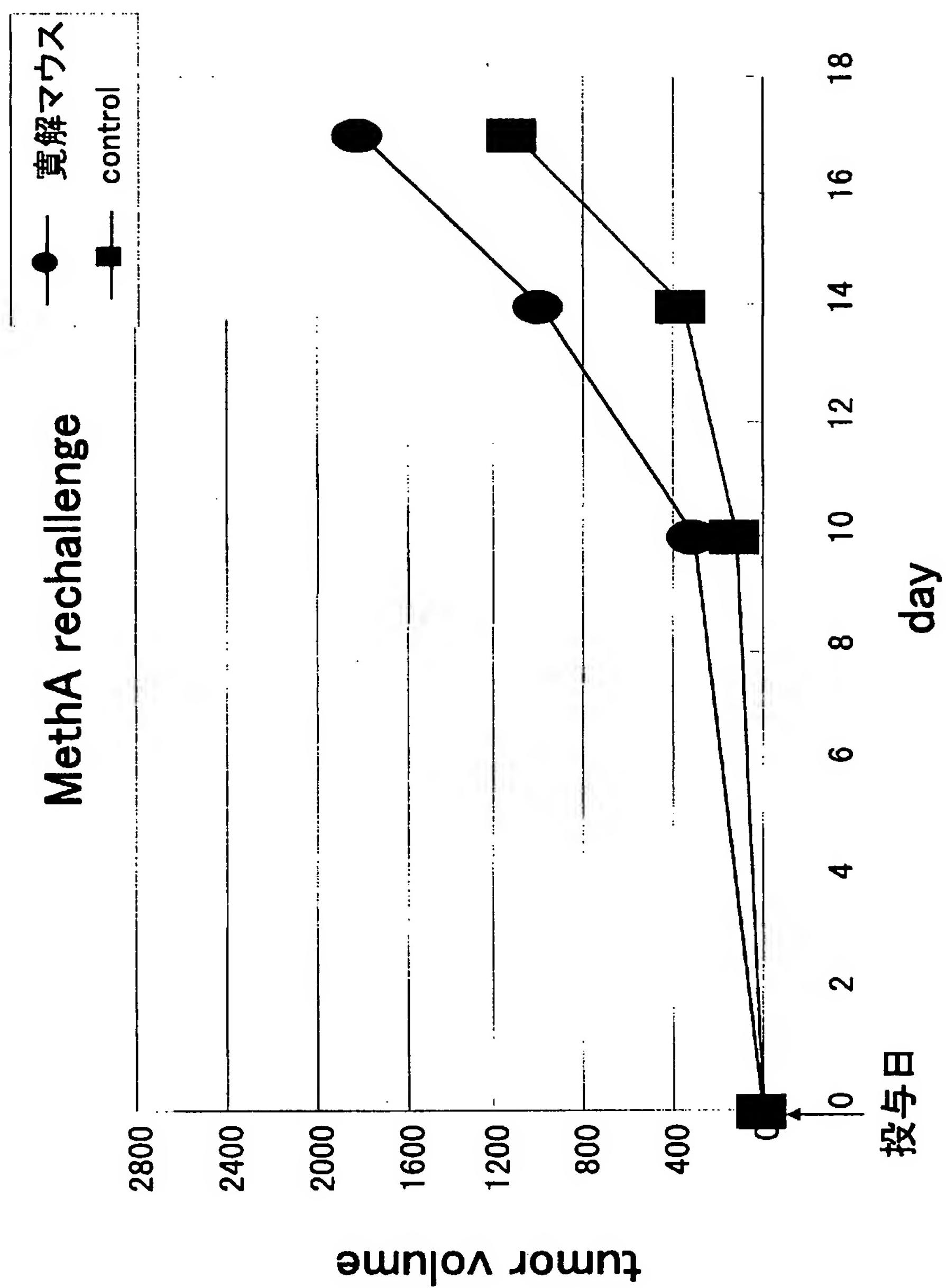
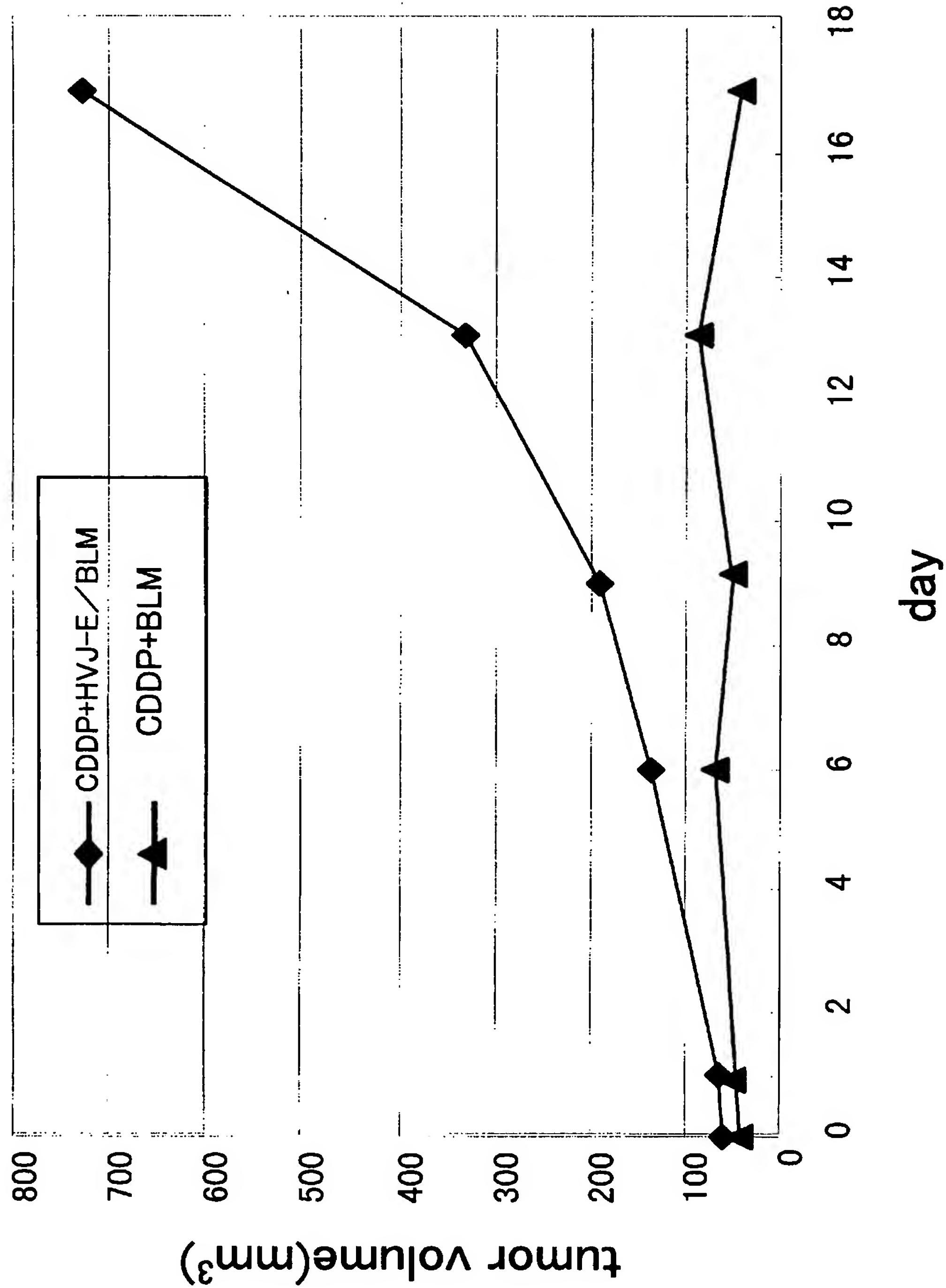


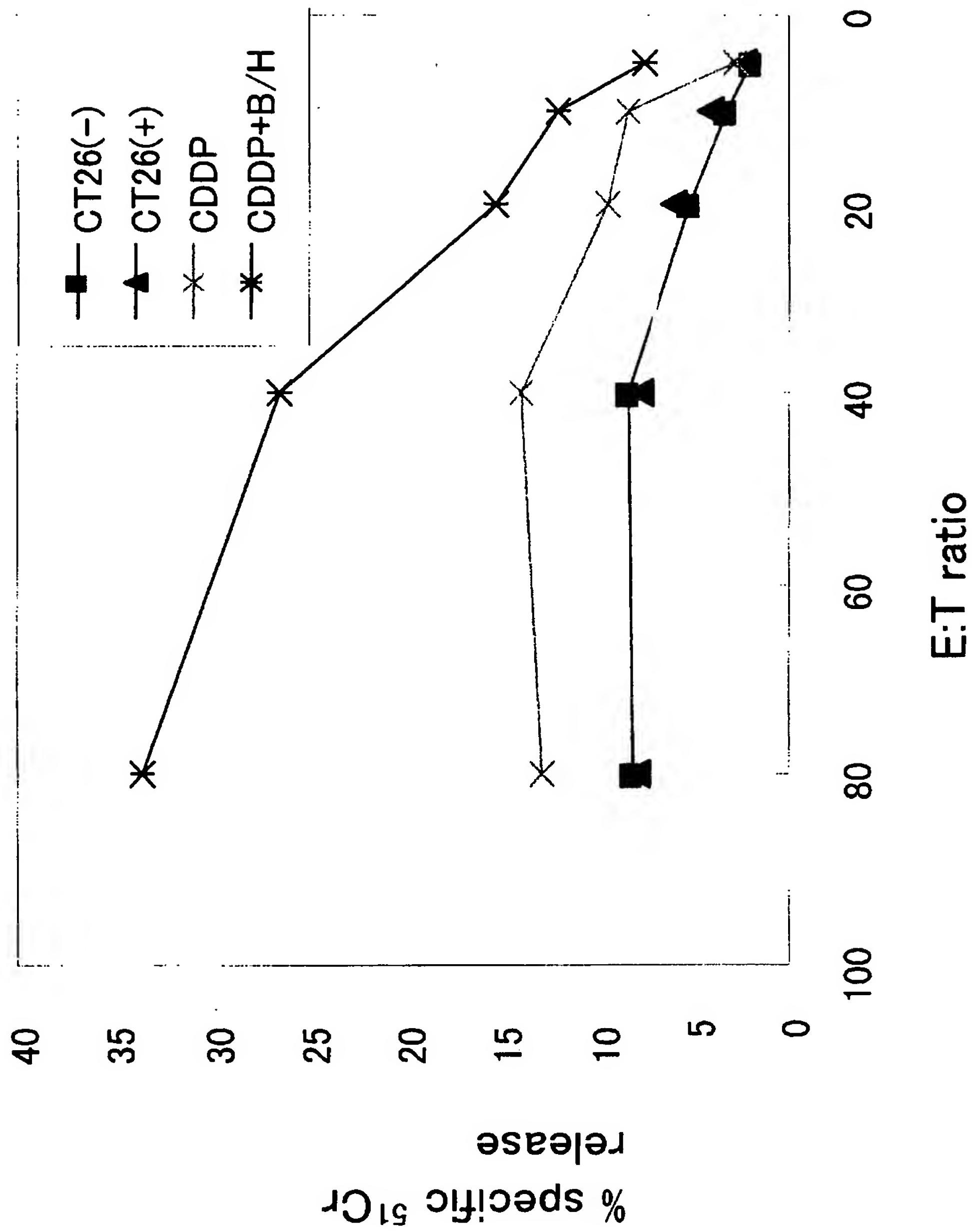
図 4】



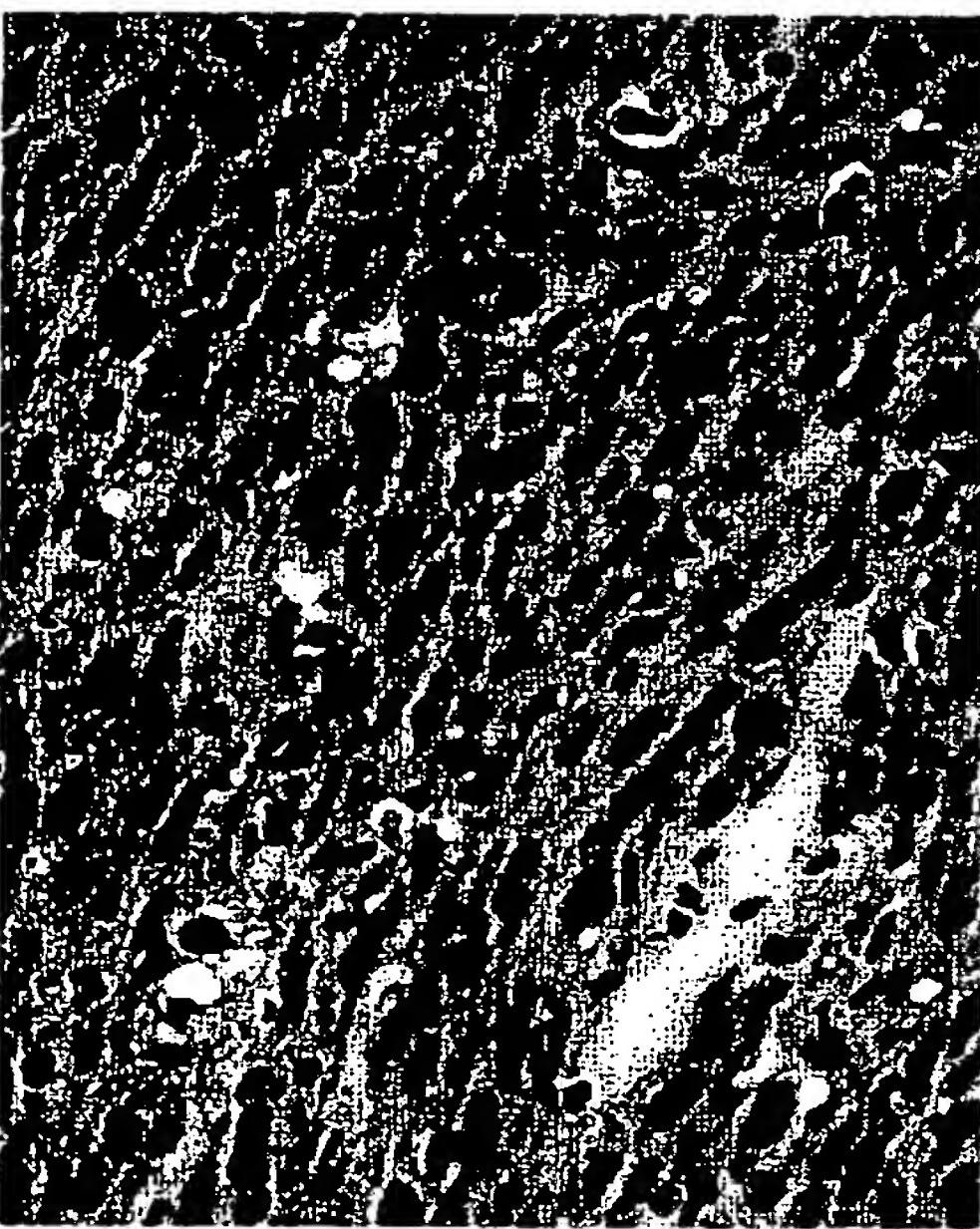
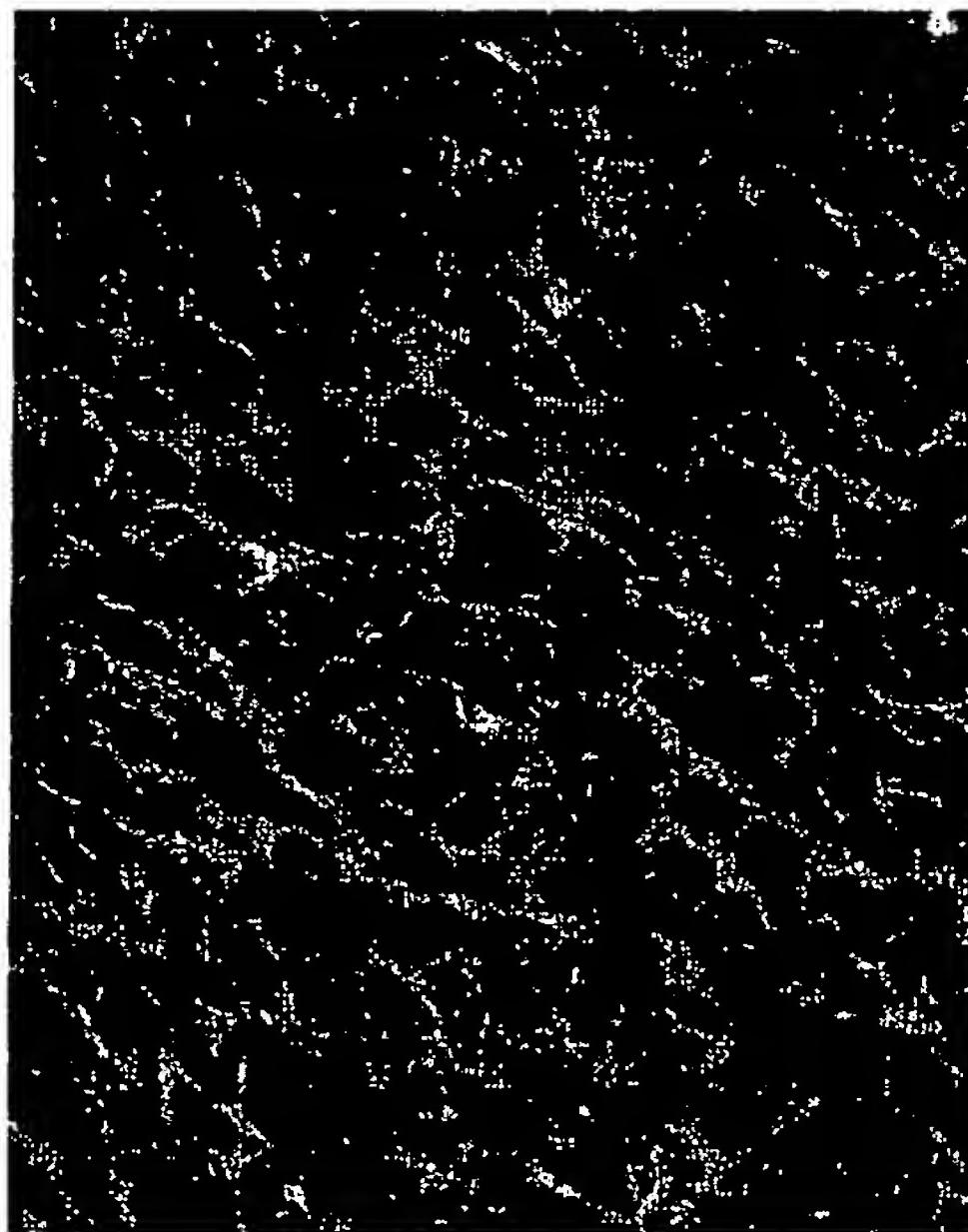
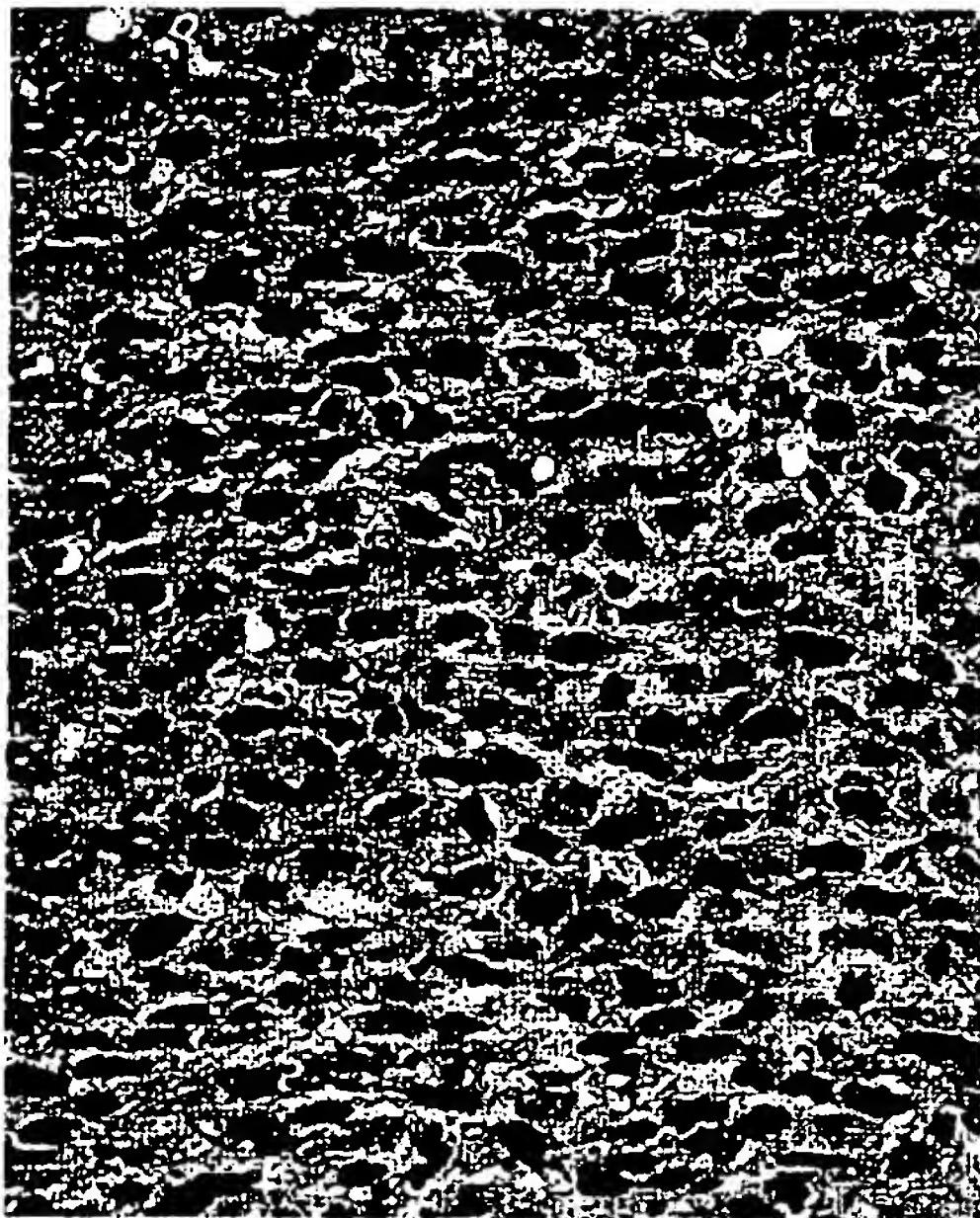
【図5】



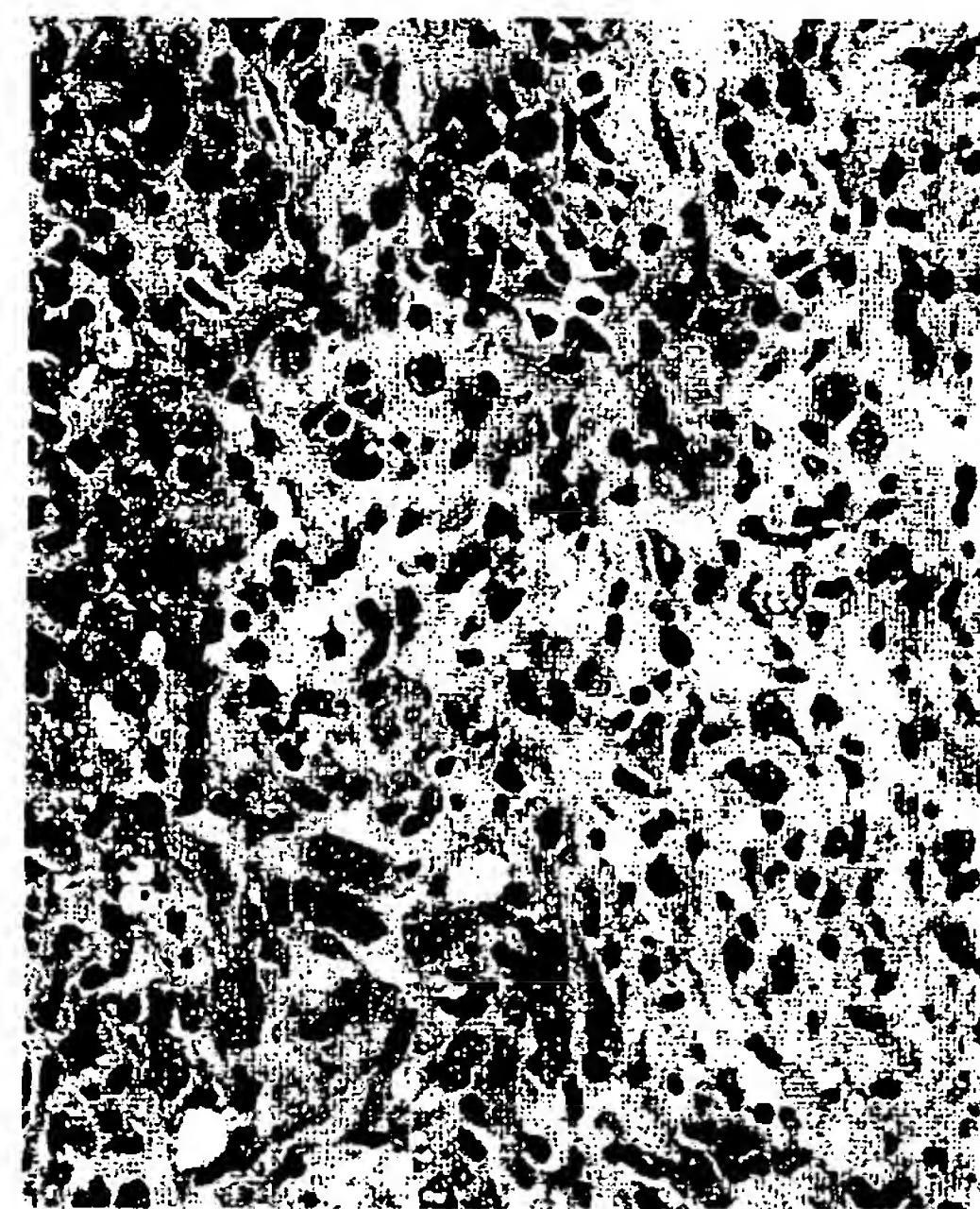
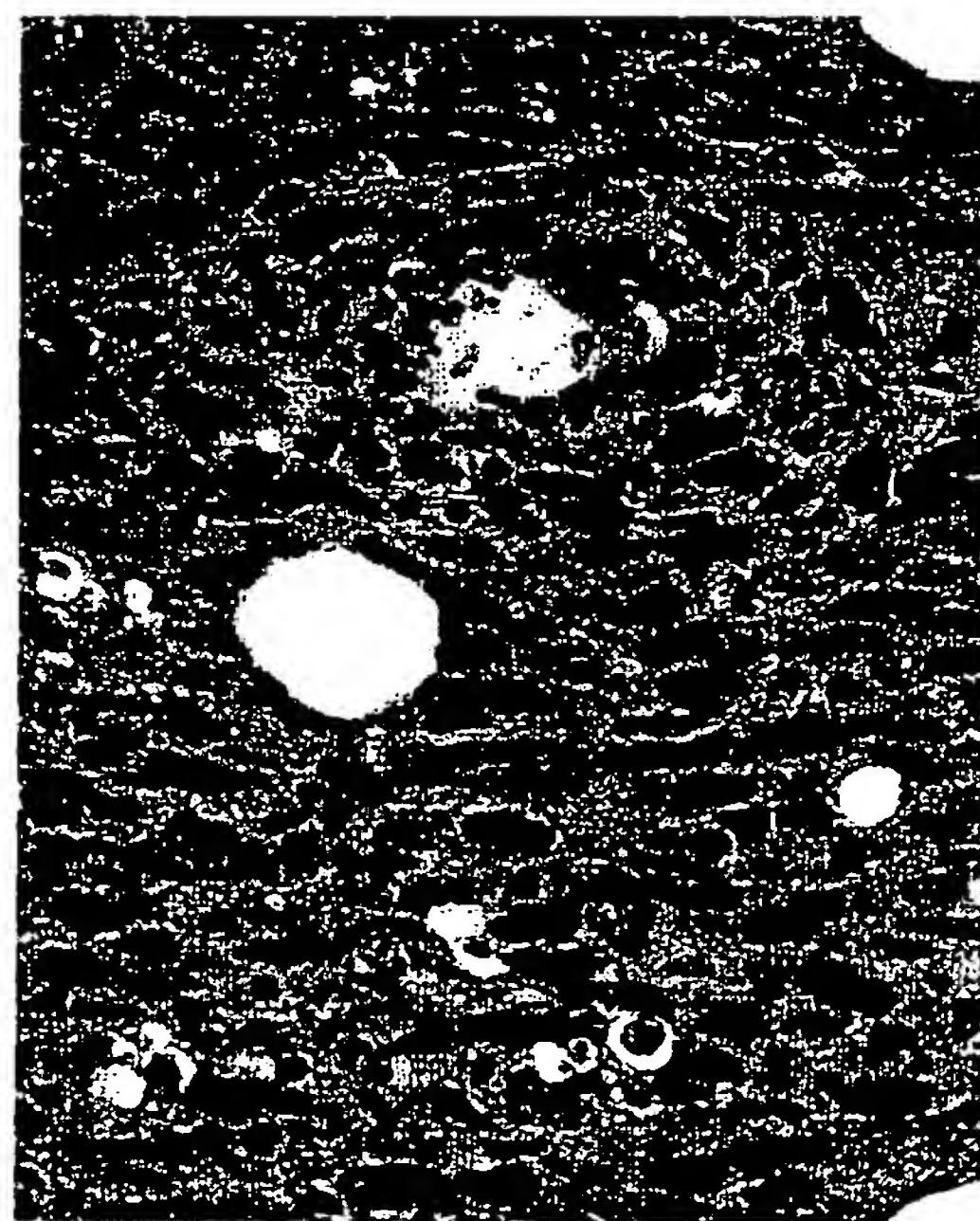
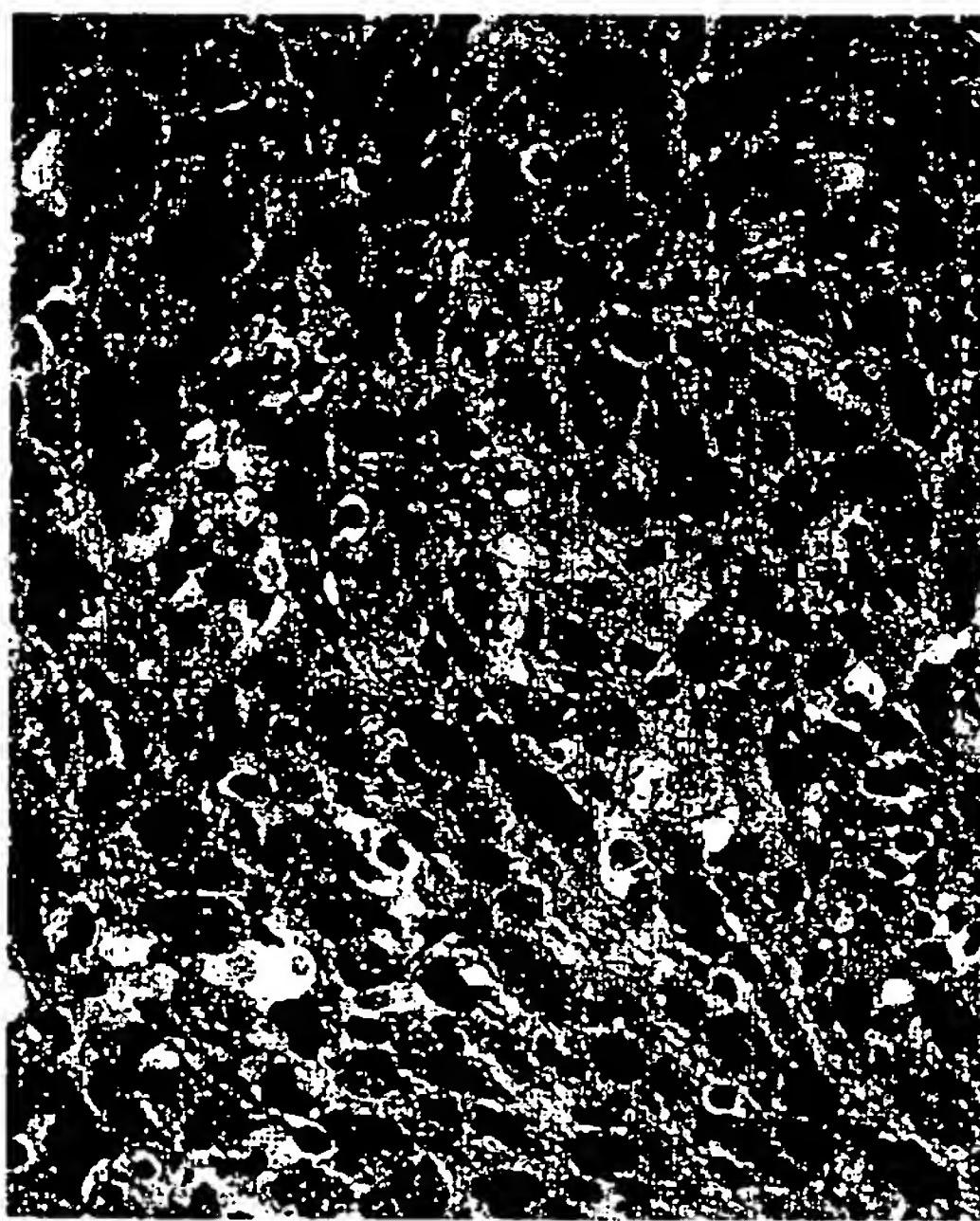
【図6】



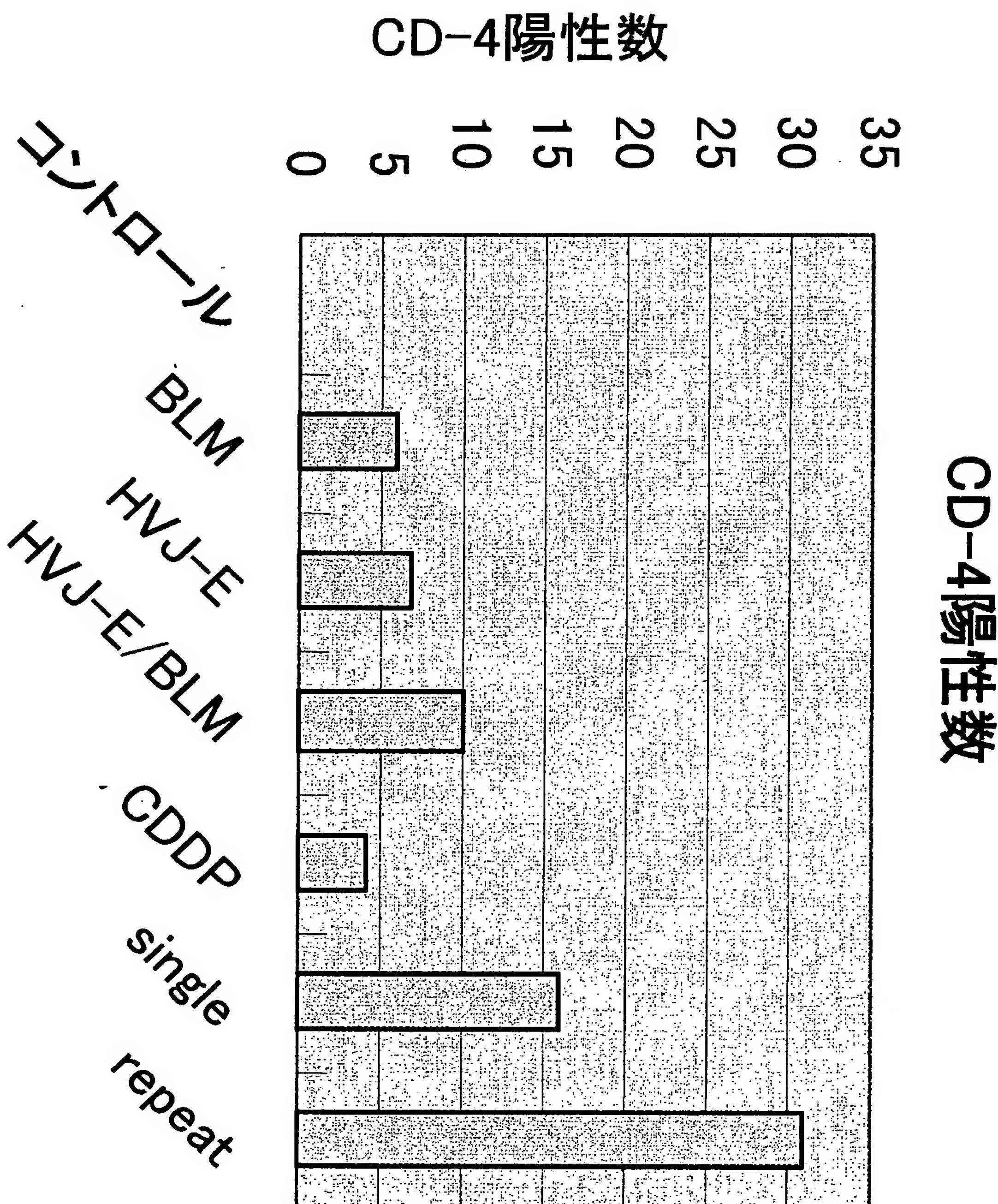
【図 7】



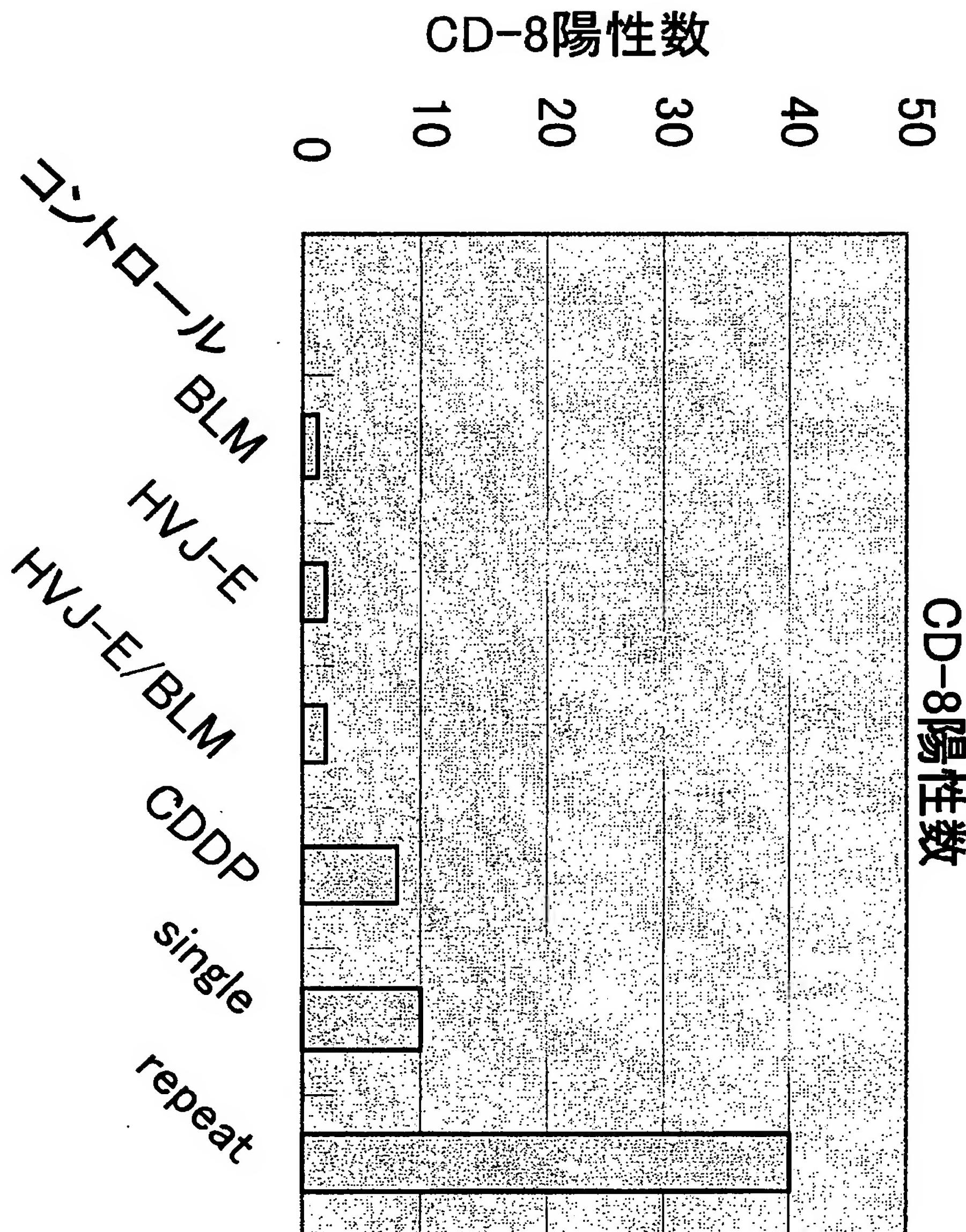
【図 8】



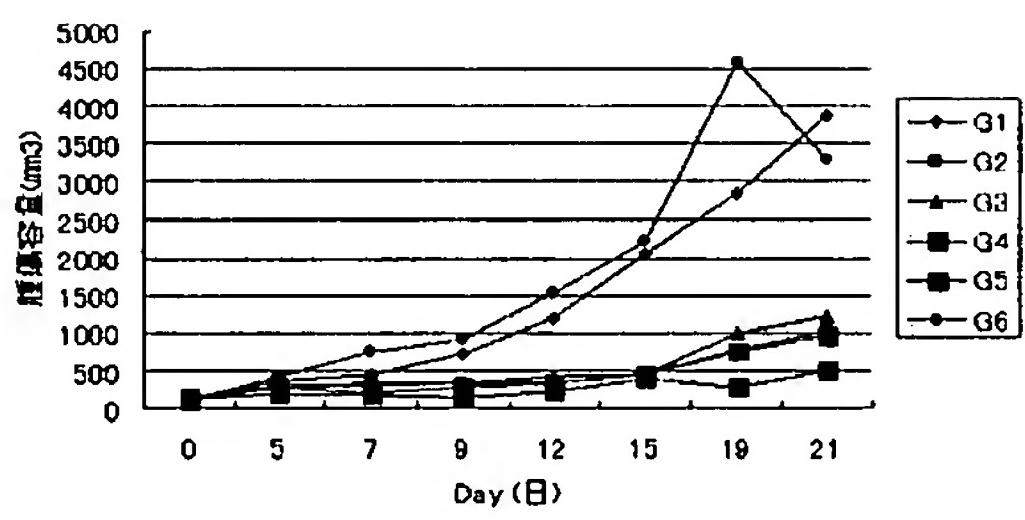
【図9】



【図10】



【図 1-1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、ウイルスエンベロープベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤、好ましくは抗癌剤を移入するための医薬組成物を提供する。

【解決手段】 免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。抗癌剤をウイルスエンベロープベクターに封入し直接腫瘍に導入し、他の抗がん剤との併用により、HVJ-Eのアジュバンド作用にも起因する腫瘍細胞特異的な抗腫瘍免疫を惹起でき、腫瘍を退縮させることができる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成17年 3月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2005- 44639
【補正をする者】
【識別番号】 500409323
【氏名又は名称】 アンジェスMG株式会社
【代表者】 山田 英
【発送番号】 024060
【手続補正】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 特許出願人
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【その他】 本件手続をしたことに相違ありません。

出願人履歴

302060281

20040916

住所変更

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号

ジェノミディア株式会社

500409323

20040916

住所変更

501447007

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号

アンジェスMG株式会社